

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790683

研究課題名(和文) ヒト膵癌増殖制御因子のRNAi/miRNA機能スクリーニング法による探索

研究課題名(英文) Exploration of tumor suppressive factors of human pancreatic cancer by microRNA functional screening assay

研究代表者

泉谷 昌志 (Masashi, Izumiya)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90532739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：この研究は、膵がんの新たな治療戦略を検討するため、形質関連遺伝子を同定する方法である機能スクリーニング系を用いた膵がん抑制的マイクロRNAの同定ならびにその機能解析を目的としている。マイクロRNA前駆体発現ウイルスライブラリーの各クローンを検出するマイクロアレイを設計し、膵がん細胞株やマウス個体においてライブラリ導入前と導入後のクローン数を半定量的に比較することで膵がんの増殖を抑制するマイクロRNAが同定された。このうち、microRNA-34(miR-34)を導入した膵がん細胞株の遺伝子発現マイクロアレイの解析により、細胞周期に関与する経路がその腫瘍増殖抑制効果の作用機序の一つと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to identify tumor-suppressive microRNAs (miRNA) of pancreatic cancer by functional screening assay, a phenotype-oriented screening method, and their functional analysis, which may lead to a new strategy of the treatment of pancreatic cancer. Microarray was designed to detect each clone contained in the virus library which expresses microRNA precursors. MicroRNAs that suppress proliferation of pancreatic cancer were identified by semi-quantitative comparison of each clone before and after introduction of miRNA library either in vitro or in vivo. Among these miRNAs was microRNA-34(miR-34): one of the mechanisms of the tumor-suppressive action appears to be through cell cycle pathway, which was shown by gene expression analysis of pancreatic cell line transfected with miR-34.

研究分野：消化器がん

キーワード：膵がん マイクロRNA 機能スクリーニング

## 1. 研究開始当初の背景

膵がんは代表的な難治性固形がんであり、さまざまな画像診断が進歩した現在においても進行症例として発見されることが多く、切除可能症例においても切除後の再発が高頻度でありその予後は極めて不良な疾患である。近年のゲムシタピンを中心とした化学療法や、FOLFIRINOX 等の多剤併用化学療法の進歩により、膵がんの生存期間中央値は改善傾向にはあるものの良好であるとは決していえず、なお有効な新規治療標的が切望されている。

がんはジェネティック/エピジェネティックな異常が年余にわたり蓄積し発症するものであるが、こういった異常は、がんの生物学的特徴を形作りものであり、がんの診断にもきわめて有用であると同時に、がんの治療標的候補ともなりうるものである。

これらがん関連遺伝子異常を同定することを目的として、ヒトがん組織・がん細胞株・発がん動物モデルなどを用いたがん遺伝子発現解析が精力的に行われてきたが、近年これと異なるアプローチとして発現解析によらずに癌関連遺伝子異常を同定する方法、すなわち機能スクリーニング法 (functional screening assay) を用いる試みも注目されている。たとえば最近でも RNAi 機能スクリーニングにより白血病細胞の新規治療標的として Brd4 が同定され、その阻害薬が有効な治療薬として有望視されているが、白血病細胞において Brd4 発現異常は軽微である。

膵がんの新規治療標的探索においても機能スクリーニング法は有望と考えられるが、ヒト膵がんにおいては間質と呼ばれる、がん細胞以外の支持組織が比較的多く存在するため、臨床検体を用いて遺伝子発現異常の解析をした場合に膵がん組織における膵がん細胞の割合が低いならば解析した遺伝子変化の解釈が難しくなると考えられ、このような場合に特に有効であると期待される。

我々もエピジェネティックな遺伝子発現制御因子の一つであるマイクロ RNA (miRNA) 機能スクリーニング系を構築し、膵がん細胞株を用いた *in vitro* での miRNA 機能スクリーニングを行い、膵がん増殖抑制的マイクロ RNA の同定が可能であることを示したが、これをさらに発展させマイクロ RNA 機能スクリーニングを *in vitro* のみならずマウス生体内で *in vivo* で行うことにより、さらに有望な膵がん治療標的を同定できることが期待される。そして同定された治療標的の機能解析により、膵がんの分子病理学的解析が進むことが期待される。

マイクロ RNA 機能スクリーニングで同定されるのはがん関連マイクロ RNA であるが、マイクロ RNA には従来の分子標的治療薬が有しない特徴を有する。それは一つのマイクロ RNA は多数の作用の異なる標的遺伝子群

の発現抑制を通じて作用を発揮するということであり、従来の単一の分子あるいは同一クラスの標的群 (マルチキナーゼ阻害薬など) にはみられない可能性を秘めていると考えられる。マイクロ RNA を直接利用した治療法については、腫瘍細胞への有効なドラッグデリバリーシステムの開発を要するが、がん関連マイクロ RNA の標的分子群を副次的な治療標的とすることも有望である。いずれにせよ、難治性固形がんである膵がんの新規治療標的探索においては、*in vivo* マイクロ RNA 機能スクリーニングを行うことにより、真に有効な治療戦略の提示ができることが期待される。

## 2. 研究の目的

本研究は、代表的な難治性固形がん (膵管上皮がん) の新しい治療戦略を探求するために、遺伝子発現には依らずに形質関連遺伝子を同定する方法であるマイクロ RNA 機能スクリーニング系を用いて、*in vitro* のみならずマウス生体内にて (*in vivo*)、膵がんの増殖に関連する因子の探索と機能解析を行い、膵癌の新規治療薬の開発候補となりうる新しい治療標的群を明らかにするために、以下を目的とする：

### (1) 探索方法の実証

マイクロ RNA 発現ウイルスライブラリーを導入した膵がん細胞株ならびにこれらのコピー数変化を検出するマイクロアレイによる機能スクリーニング系ならびに、免疫不全マウスに前述のライブラリーを導入した膵がん細胞株の皮下または同所移植モデルを組み合わせることによって、膵がん抑制的マイクロ RNA の同定が可能であることを実証する。なお、このような探索方法が可能であることが実証されれば、膵がんのみならずその他のがん腫においても、がん抑制的マイクロ RNA の探索が可能であると考えられる。

### (2) 機能解析

前項で同定された膵がん抑制的マイクロ RNA を膵がん細胞株へ導入し、その遺伝子発現の変化をオリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いて網羅的に解析することにより、膵がん細胞株の増殖を抑制する機序について明らかにする。

同定された膵がん抑制的マイクロ RNA そのものは既存のあるいは新規の適切なドラッグデリバリーシステムを用いることにより新規治療法となりうる可能性がある。これ以外にも機能解析による膵がん抑制的マイクロ RNA の標的分子探索により、これらを代理の標的とした既存の分子標的治療薬の活用または、新規分子標的治療薬の開発へと

つながることが期待される。

### 3. 研究の方法

#### (1) in vitro でのマイクロ RNA 機能スクリーニング

マイクロ RNA 機能スクリーニングでは、約 600 種のマイクロ RNA 前駆体発現ウイルスライブラリー (System Biosciences) を膵がん細胞株へ導入し、これを継代する。導入直後 (T0) の細胞ならびに一定期間 (2~4 週程度) 継代後 (T1) の細胞集団より DNA を抽出し、それぞれ異なる蛍光色素 (Cy3, Cy5) でラベル化し、マイクロアレイ上に競合的にハイブリダイゼーションすることにより、各マイクロ RNA クローンの導入直後と継代後のコピー数変化 (T0 vs T1) を蛍光強度比として半定量的に検出する。なお、マイクロアレイは、我々のカスタム作成のものを用いる。

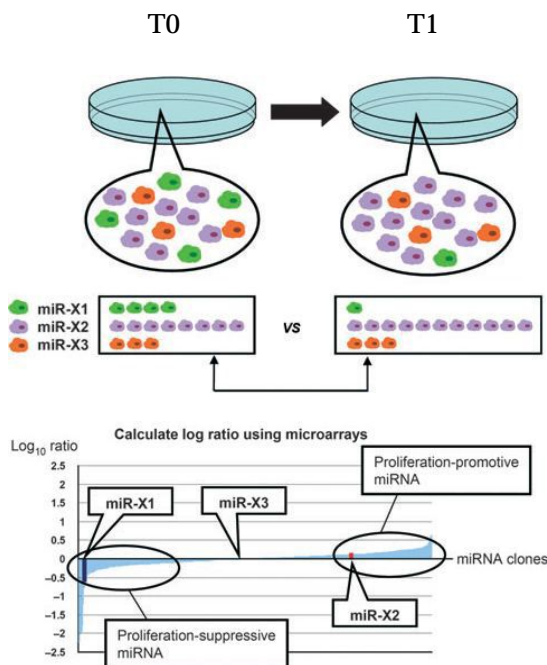
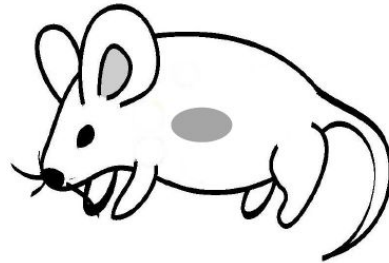


図 1 : マイクロ RNA 機能スクリーニング系を用いた膵がん増殖制御因子の in vitro 探索

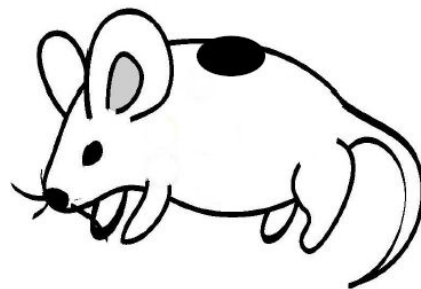
#### (2) in vivo での miRNA 機能スクリーニング

前項と同様に、マイクロ RNA ウイルスライブラリーを膵がん細胞株へ導入後、ヌードマウスの膵 (同所) または皮下へ移植する。ライブラリー導入時の細胞 (T0) ならびに移植継代後の腫瘍 (T1) より抽出した DNA をそれぞれ異なる蛍光色素 (Cy3, Cy5) でラベル化し、マイクロアレイ上に競合的にハイブリダイゼーションすることにより、各マイクロ RNA クローンの導入直後と継代後のコピ

ー数変化 (T0 vs T1) を蛍光強度比として半定量的に検出する。これら in vitro/in vivo でのマイクロ RNA 機能スクリーニングで同定された膵がん増殖関連因子候補は、主にその標的遺伝子の重複性に注目して候補をさらに絞り込む。



膵がん細胞株同所移植



膵がん細胞株皮下移植

図 2 : マイクロ RNA 機能スクリーニング系を用いた膵がん増殖制御因子の in vivo 探索

### 4. 研究成果

#### (1) マイクロ RNA 機能スクリーニング系に用いるマイクロアレイの作成

まず、マイクロ RNA 導入細胞株の定量的変化を検出するためのオリゴヌクレオチドマイクロアレイが作成された。すなわち、約 600 種類のマイクロ前駆体 (400~500 塩基対) 発現レンチウイルスベクターを導入した細胞株の定量的変化を特異的に検出するためのプローブを、それぞれの前駆体に対して 2 種類ずつ、合計約 1,200 種類作成することが可能であった。それぞれのプローブを 13 回の繰り返しでランダムに配置し、合計約 15,000 のプローブがガラス基板上に in situ 合成されたマイクロアレイが作成された。マイクロアレイの再現性については、細胞株の DNA を異なる 2 色の傾向色素でラベル化し、良好な再現性が確認された。

#### (2) 膵がん細胞株 MIA-PaCa2 ならびにマイクロ RNA 発現ベクターを用いた in vitro ならびに in vivo 機能スクリーニング

マイクロ RNA 前駆体発現レンチウイルスライブラリーを導入した膵がん細胞株

MIA-PaCa2を細胞培養による継代(in vitro)し、導入直後ならびに2週間継代後のサンプルを得た。また、同じくマイクロRNA前駆体発現レンチウイルスライブラリーを導入した膵がん細胞株MIA-PaCa2を免疫不全マウスの皮下または膵同所移植し、導入直後ならびに移植2週間後における個体から回収した腫瘍を得た。これら導入直後(T0)ならびに導入後(T1)のマイクロRNA前駆体クローン数の変化(T1 vs. T0)を、前項で作成したマイクロアレイにより蛍光強度比として定量的に比較した結果により、膵がん細胞株の増殖を抑制するマイクロRNAとしてマイクロRNA-34(miR-34)が同定された。

### (3) 膵がん抑制的マイクロRNAの機能解析

前項で同定されたmiR-34の合成体(Ambion)を膵がん細胞株MIA-PaCa2に導入し、これとネガティブコントロールのマイクロRNAを導入したものととの遺伝子発現の変化を遺伝子発現オリゴヌクレオチドマイクロアレイ(Agilent Technologies)を用いて解析したところ、その主要な経路としてE2F, CDKをはじめとする細胞周期に関連した細胞内経路が影響を受けていることが明らかとなった。

また、複数のマイクロRNAの標的のデータベース(MirTarBase, TarBase)のin silico探索を行ったところ、E2F1, E2F3, CDK4がmiR-34aの標的遺伝子であることが明らかとなった。

上記(1)~(3)の結果により、マイクロRNA発現ウイルスライブラリーとこれらを検出するマイクロアレイによるマイクロRNA機能スクリーニング系および同ライブラリーを導入した膵がん細胞株MIA-PaCa2を用いて、細胞株によるin vitroスクリーニングのみならず、マウス皮下または同所移植によるマウス生体内(in vivo)でのマイクロRNA機能スクリーニングが可能であることが実証された。さらに、同スクリーニングで同定された膵がん抑制的マイクロRNAであるmiR-34の機能解析により主要な膵がん細胞株増殖抑制の機序として細胞周期への影響があることが明らかとなり、またmiR-34を導入した膵がん細胞株MIA-PaCa2の遺伝子発現オリゴヌクレオチドマイクロアレイの解析により、その主要な膵がん増殖抑制効果の機序として細胞周期の関与が明らかとなった。さらに、マイクロRNA標的データベースの探索により、細胞周期に関与する遺伝子がmiR-34の標的となっていることも明らかとなった。これらの結果は、miR-34ならびにその標的である細胞周期に関与した遺伝子が膵がんの新規治療の有力候補であることを示唆しており、今後膵がん動物モデルを用いたmiR-34の腫瘍抑制効果の実証や、さらには適切なドラッグデリバリーの開発

が進めばヒトでの新規治療へとつながることが期待される。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Ogata-Kawata H, Izumiya M, *et al.*  
Circulating exosomal microRNAs as biomarkers of colon cancer. PLoS One. 査読あり. 2014 Apr 4;9(4):e92921.  
doi: 10.1371/journal.pone.0092921

[学会発表](計0件)

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

泉谷 昌志 (IZUMIYA, Masashi)  
東京大学医学部附属病院・環境安全管理室・講師  
研究者番号: 90532739